

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 9 月 15 日 (15.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
**WO 2005/085465 A1**

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: **C12P 23/00** // A23D 9/007,  
A23L 1/30, C12P 23/00, C12R 1:89)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/003465

(22) 国際出願日: 2005 年 3 月 2 日 (02.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2004-060736 2004 年 3 月 4 日 (04.03.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サン  
トリー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP]; 〒  
5308203 大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 1 番 4 0 号  
Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 東山 堅一 (HI-  
GASHIYAMA, Kenichi) [JP/JP]; 〒6580073 兵庫県神  
戸市東灘区西岡本 2-2 6-1-2 2 5 Hyogo (JP). 柿  
藺 俊英 (KAKIZONO, Toshihide) [JP/JP]; 〒7390023 広  
島県東広島市西条町下三永 3 5 4-1 5 1 Hiroshima  
(JP).

(74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒  
1000004 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大  
手町ビル 2 0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo  
(JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護  
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,  
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,  
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING ASTAXANTHIN-CONTAINING LIPID

(54) 発明の名称: アスタキサンチン含有脂質の製造方法

(57) Abstract: It is intended to improve a method of culturing green alga Haematococcus pluvialis to thereby attain striking acceleration of nursing cell proliferation and astaxanthin biosynthesis over the prior art and thus to provide a process for efficiently producing astaxanthin from the culture. There is provided a process comprising culturing green alga Haematococcus pluvialis in a culture medium wherein use is made of an organic nitrogen source of  $\leq 65\%$ , preferably  $\leq 43\%$ , still preferably  $\leq 35\%$  AN/TN ratio to thereby obtain an alga having astaxanthin-containing lipid accumulated therein. If necessary, the astaxanthin-containing lipid is extracted from the alga, and if desired, the extract is further purified.

(57) 要約: 本発明は、緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスの培養方法を改善することによって、栄養細胞増殖およびアスタキサンチン生合成を従来法より大幅に促進せしめ、該培養物から効率よくアスタキサンチンを製造する方法を提供することを課題とする。この課題を解決するために、緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスを、AN/TN 比が 65% 以下、好ましくは 43%、より好ましくは 35% 以下の有機窒素源を培地中に用いて培養し、アスタキサンチン含有脂質を蓄積させた藻体を得、必要であれば、さらに該藻体からアスタキサンチン含有脂質を抽出し、所望によりこれをさらに精製する。

WO 2005/085465 A1

## 明 細 書

### アスタキサンチン含有脂質の製造方法

#### 技術分野

- [0001] 本発明は、緑藻ヘマトコッカス・プルビアリス(Haematococcus pluvialis)を培養し、培養物からアスタキサンチンを含む脂質を採取することを特徴とする、アスタキサンチン含有脂質の製造方法に関する。

#### 背景技術

- [0002] アスタキサンチンは、甲殻類の殻や卵、鮭の肉、キンメダイの表皮など、動物界にきわめて広く分布している赤色カロチノイドの一種であり、肉色や体色の発現に関わっている。アスタキサンチンの用途としては、赤色色素として養殖マスや養殖マダイの発色飼料として利用されている(生物工学会誌 71(4):233-237 (1993))ほか、その強力な抗酸化作用により、医薬活性成分としての用途も検討されている(特許第3163127号)。また、健康食品の素材としても既に実用化されている(Food Style 21, 5(12):25-35 (2001))。
- [0003] 緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスは細胞内に多量のアスタキサンチンを蓄積することから、その培養によるアスタキサンチン生産が実用化されている(NatuRose Technical Bulletin #78, Cyanotech Corporation (2000); Food Style 21, 5(12):25-35 (2001))。ヘマトコッカス・プルビアリスのライフサイクルには、栄養細胞とシストが存在することが特徴である。栄養細胞(vegetative cell)とは、2本の鞭毛を有する卵型の遊泳細胞であり、ゼラチン状の細胞壁を持つ。栄養細胞のアスタキサンチン含量は10pg/cell程度と低い(J. Ferment. Technol. 74(1):17-20 (1992))。それに対して、シスト(cyst, 別名aplanospore, akinete)とは、球形細胞であり、ゼラチン質の内側に硬い細胞壁を有し、鞭毛を持たないことが特徴であり、栄養細胞とシストとは観察により明確に区別することができる。栄養細胞から変化したばかりのシストはアスタキサンチン含量が低く、褐色あるいは赤褐色の色調を有し未成熟シスト(brown-red immature cyst)と呼ばれている。未成熟シストのアスタキサンチン含量は30 pg/cell程度(Biotechnol. Lett. 19(6):507-509 (1997))である。培養条件を適切に整えることによつ

て、培養時間とともにシスト細胞内のアスタキサンチン含量が増加し、赤色の色調へと変化し、このようなシストは成熟シスト (red mature cyst) と呼ばれている。アスタキサンチン含量の高いシストとしては 613pg/cell (Biotechnol. Lett. 16(2):133-138 (1994)) もの高含量の報告がある。

[0004] ヘマトコッカス・プルビアリスの培養によるアスタキサンチン生産条件の検討は、その殆どが光照射を伴う明所培養で行なわれ、例えば屋外池で太陽光を利用してヘマトコッカス・プルビアリスを培養する方法や、屋外ドームで太陽光を利用してヘマトコッカス・プルビアリスを培養する方法でアスタキサンチンの工業生産が行なわれている (Food Style 21, 5(12):25-35 (2001))。一般に緑藻類は光合成によりエネルギーを得るため、明所でなければ増殖やアスタキサンチン生産が行なえないと考えられてきたためである (生物工学会誌, 71(4):233-237 (1993))。これら太陽光を利用した明所培養は、光照射のためのエネルギーコストや、光照射装置の設備投資費用が安価である反面、屋外系において雑菌汚染を防止するための対策が必要である。一方、屋内で明所培養を行なうためには、光照射のためのエネルギーコストや照射設備の投資コストがかかることが問題である。コストダウンを目的とした様々な研究開発が行なわれている。例えば、光照射効率を高める目的でチューブラーリアクター (J. Appl. Phycol. 5:593-604 (1993)) やエアリフト型光リアクター (J. Ferment. Bioeng. 82:113-118 (1996)) などを用いた培養が報告されている。しかしながら、それらの技術は実用化のためには、未だ改良の余地がある。

[0005] 上記の問題を解決するために、光に依存しない暗所培養が研究され、暗所においても、酢酸を炭素源にすることによって緑藻が栄養細胞として増殖すること、さらに、増殖と連動してアスタキサンチンが細胞内に蓄積されることが見出された (J. Ferment. Bioeng. 74:17-20 (1992))。さらに、培地の塩濃度を高める方法や (Biotechnol. Lett. 19(6):507-509 (1997))、通気などの手段によって好気条件にすることによって (本出願人の特願2002-294420)、暗所培養においてもシストを形成できることも見出された。

[0006] 一方、アスタキサンチンの製造のためのヘマトコッカス・プルビアリスの培養においては、細胞構築に必要な培地窒素源としては無機窒素が主に用いられ、例えば、硝

酸塩 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 53:530–535 (2000)) や尿素 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 55:537–540 (2001)) が培地窒素源とされてきた。これに対して、有機窒素源、例えば、脱脂大豆粉のようなタンパク含量の高い窒素源の場合は、発泡性が極めて高く、かつ水不溶成分を多く含むため、大型の屋外開放系リアクターなどでは均一混合が困難であり、CSL (コーンステープリカー) は、糖精製の副産物の液体であることから、特に微生物混入量などの品質が一定でなく、培地殺菌が困難な屋外開放系リアクターでは微生物汚染の原因になりやすいと考えられる。また、雑菌汚染の主な原因となる従属栄養微生物の混入と増殖を最小限に抑え、かつ光合成によって独立栄養増殖できる緑藻の増殖をより優勢にするために、培地成分はできるだけ貧栄養状態にする方法が採られてきた。このような理由により、藻類培養によるアスタキサンチン製造においては、有機窒素源が用いられた報告はすくない。

特許文献1: 特許第3163127号

特許文献2: 特願2002-294420

非特許文献1: 生物工学会誌 71(4):233–237 (1993)

非特許文献2: Food Style 21, 5(12):25–35 (2001)

非特許文献3: NatuRose Technical Bulletin #78, Cyanotech Corporation (2000)

非特許文献4: J. Ferment. Technol. 74(1):17–20 (1992)

非特許文献5: Biotechnol. Lett. 19(6):507–509 (1997)

非特許文献6: Biotechnol. Lett. 16(2):133–138 (1994)

非特許文献7: J. Ferment. Bioeng. 74:17–20 (1992)

非特許文献8: J. Appl. Phycol. 5:593–604 (1993)

非特許文献9: J. Ferment. Bioeng. 82:113–118 (1996)

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスの培養方法を改善することによって、栄養細胞増殖およびアスタキサンチン生合成を従来法より大幅に促進せしめ、該培養物から効率よくアスタキサンチン含有脂質を製造する方法を提供することを目的とする。



[0008] 本発明はまた、屋外開放系培養に付随する雑菌汚染の問題を避け、緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスを屋内リアクターまたは屋外閉鎖系培養で効率よく増殖させて、アスタキサンチンを製造する方法を提供する。本明細書において、閉鎖系とは密閉または半密閉容器内の制御された環境中で培養を行うことを意味し、これは、開放系では緑藻が制御されていない環境に曝されるために生じる天候(気温、湿度、光の量等)や空中浮遊微生物等の周囲の環境変化の影響を受け易いという問題が、少ないか無視できることを意味する。

#### 課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、従来使用が避けられていた有機窒素源に着目し、その影響について鋭意検討を重ね、総窒素に占めるアミノ態窒素の割合(AN/TN比)の低い有機窒素源が、緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスの細胞増殖およびアスタキサンチン合成に有効であることを見出し、本発明を完成させた。

[0010] 本発明の方法は、緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスを、AN/TN比が65%以下、好ましくは43%以下、より好ましくは35%以下の有機窒素源を培地中に用いて培養し、アスタキサンチン含有脂質を蓄積させた藻体を得、必要であれば、さらに該藻体からアスタキサンチン含有脂質を抽出し、所望によりこれをさらに精製することからなる。

#### アスタキサンチン

緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスによって生合成されるアスタキサンチン(3,3'-ジヒドロキシ- $\beta$ ,  $\beta$ -カロテン-4,4'-ジオン)は、遊離型とエステル型で細胞内に蓄積される。エステル型としては、例えば、アスタキサンチン脂肪酸モノエステル、アスタキサンチン脂肪酸ジエステルが挙げられる(J. Ferment. Bioeng. 71:335-339 (1991); Phytochemistry 20:2561-2564 (1981))。本発明において、アスタキサンチン含有脂質とは、これら遊離型アスタキサンチンおよび/又はエステル型アスタキサンチンの単品あるいは混合物を意味する。さらに、アスタキサンチン含有脂質とは、アスタキサンチン、およびアスタキサンチンを含有するヘマトコッカス・プルビアリス藻体由来の脂溶性成分混合物も意味する。

#### 緑藻

本発明に用いる緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスは、単細胞で淡水に生息する緑

藻類であり、例えば、Haematococcus pulvialis ASTB BS2, CALU 9, CALU 333, CAUP G1002, CCAO, IBASU 38, IPPAS H-23, MUR 01, 02, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 75, 76, 77, NIES 144, NIVA CHL9, SMBA がある("World Catalogue of Algae" p.132-133, Japan Scientific Societies Press (1989))。

Haematococcus lacustrisの中にはヘマトコッカス・プルビアリスと同一のものもあり、このような同一のものとしてATCC 30402, SAG 34-1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1h, 1k, 1l, 1m, 1n, UTEX 16がある("World Catalogue of Algae" p.132-133, Japan Scientific Societies Press (1989))。

- [0011] 緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスの栄養細胞(vegetative cell)は、通常、2本の鞭毛をもつ遊泳細胞として存在し、緑藻クラミドモナスと同様に親細胞の壁内で分裂して増殖する。栄養細胞の周りには、ゼラチン状の細胞壁を持つ。栄養細胞は、培養条件が整えばゼラチン質の内側に厚い強固な細胞壁を発達させ、やがて細胞は遊泳を停止して、無性的あるいは有性的に、硬い細胞壁を有しアスタキサンチン含有脂質を大量に含有し得るシスト(cyst, 別名; aplanospore, akinete)を形成し、培養条件が整えば著量のアスタキサンチンを蓄積し、未成熟シストから成熟シストへと変化する(J. Ferment. Bioeng. 84(1):94-97 (1997))。このように、緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスのライフサイクルには栄養細胞とシストが存在するが、栄養細胞とシストの判別は観察によって容易に行なうことができる。

#### 培地

ヘマトコッカス・プルビアリスの培養は、以下の条件で行なう。

- [0012] 基本培地: 基本培地はBM4培地(組成は実施例1を参照)、特許文献1〜2、非特許文献4〜9、Appl. Microbiol. Biotechnol., 53:530-535 (2000)、およびAppl. Microbiol. Biotechnol., 55:537-540 (2001)に記載されている培地等の、緑藻類の増殖に用いられる培地から適宜選択してよい。
- [0013] 有機窒素源: 本発明によれば、基本培地に添加する有機窒素源として、総窒素に占めるアミノ態窒素の割合(AN/TN比)の低い有機窒素源を使用する。ここで、アミノ態窒素とは、ペプチドに含まれるアミノ酸残基の窒素以外の窒素をいい、主として遊離アミノ酸中の窒素を意味する。好ましくは有機窒素源のAN/TN比は65%以下、

好ましくは43%以下、さらに好ましくは35%以下である。

[0014] 培地に添加する有機窒素源の濃度は、好ましくは0.1g/L以上とする。

[0015] AN/TN比65%以下の窒素源としては、例えば、脱脂大豆粉、カゼイン、CSL(コーンステープリカー)など単独であるいは複数組み合わせる用いることができる。さらに、脱脂大豆粉を分解した大豆ペプチド、カゼインを分解したペプトン、トリプトン、ポリペプトンなど単独あるいは複数組み合わせる用いることもできる。AN/TN比が65%以下の有機窒素源であれば何ら制限無く用いることができるが、好ましくは脱脂大豆粉あるいはCSLを単独もしくは他の窒素源と組み合わせる用いる。これら窒素源に加えて、従来から知られている(特許第3163127号)窒素源として、硝酸塩、尿素、アンモニウム塩のような無機窒素源、さらにアスパラギン、グリシン、グルタミン等のアミノ酸、あるいはAN/TN比が65%を超える酵母エキスのような有機窒素源も使用可能である。

[0016] 有機窒素源のAN/TN比が65%以下、好ましくは43%以下、さらに好ましくは35%以下であることの確認は、アミノ態窒素(AN)はバンスライク法で、総窒素(TN)はケールダール法で測定し、ANとTNの測定値の比率を計算してAN/TNを求めることによって行うことができる。

[0017] 炭素源:緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスは、自然界においては、炭酸ガスと光エネルギーで生育する光合成生物である。したがって、明所培養して、炭酸ガスを炭素源とする独立栄養増殖をさせることが可能である。その場合は、培地に炭素源を添加せずに増殖させることも可能であり、あるいは所望により、明所培養においても従属栄養として下記の炭素源を用いることもできる。本明細書において、明所とは、典型的には日中の明るさをいうが、培養施設点検時に最低限必要な明るさ以上に明るい場所は本明細書の明所に含まれる。

[0018] 緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスは、暗所培養することもできる。その場合は、炭酸ガスに代替し得る炭素源を従属栄養として十分な量含む培地を用いる必要がある(生物工学会誌, 71(4):233-237 (1993))。炭素源として、例えば、従来から知られている酢酸、ピルビン酸、エタノール、TCA関連有機酸等など(特開平11-56346)のほかに、糖、脂肪酸、脂肪酸エステルおよび油脂などを用いることができる。TCA関連有

機酸としては、例えば、クエン酸、 $\alpha$  ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸等（特許第3163127号）がある。炭素源としては、これら何れも用いることができるが、好ましくは酢酸を使用する（J. Ferment. Bioeng. 74(1):17-20 (1992)）。

[0019] 炭素源は、0.01 g/L 以上の量で培地に使用する。

[0020] 当業者にとって理解されたとおり、本明細書において暗所培養という用語は、完全な暗所のみならず、意図的な照明を行わず、培地に炭素源を添加して従属栄養的に増殖させる場合を全て総称する意味で用いられている。したがって、培養状況の点検のため、一時的に照明をすることや、継続的に低強度の照明を行う場合も、本発明における暗所培養に含まれる。

[0021] 上記培地成分の他に、アスタキサンチン合成を促進させるために、二価鉄イオン( $\text{Fe}^{2+}$ )を生じる無機塩類や、 $\text{H}_2\text{O}_2$ などを添加して酸化ストレスを与えることができる（生物工学会誌, 71(4):233-237 (1993)）。

#### 前培養

ヘマトコッカス・プルビアリスを液体培養し、その藻体あるいはアスタキサンチン含有脂質を得るためには、保存藻体をまず少量の培地に接種し、その後、大容積の培地へと順次接種を行いながらスケールアップを図るが、本培養とは、藻体あるいはアスタキサンチン含有脂質を回収するために行なう最終ステップの培養を意味する。また、前培養とは順次継代しながら行なうスケールアップ途上の各段階の培養を意味する。

[0022] 前培養条件としては、明所培養で独立栄養増殖又は従属栄養増殖させるか、あるいは暗所培養で従属栄養増殖させるか、何れの方法でもよい。また、前培養で得られる細胞形態も栄養細胞あるいはシストの何れでもよい。本培養へ接種する藻体はできるだけ多いほうが好ましいため、前培養においては、より増殖能の高い栄養細胞で培養するほうが好ましい。

[0023] 培養温度については、前培養および下記本培養ともに、栄養細胞では15〜25℃が適しており、好ましくは20℃前後である。シストでは、25〜35℃が適しており、好ましくは30℃前後である。

#### 本培養



本培養へ接種する前培養の藻体は多いほうが好ましい。前培養から本培養へ接種する細胞形態は、栄養細胞あるいはシストの何れでもよいが、本培養中に、シスト化を誘発してアスタキサンチン含量を高めることが好ましい。

- [0024] 本培養を暗所で行なう場合に、シスト化を誘発しアスタキサンチン含量を高めるためには、好氣的条件が必要である。好氣的条件にする手段としては、培養液上面から液中への酸素の拡散、培養液の振盪や攪拌による上面空気の巻き込み、培養液中への空気通気、培養液中への空気通気と攪拌の組合せなどの方法を一つあるいは組み合わせて行なう。中でも、培養液中に通気するのが好ましく、相対通気量0.01vvm以上で通気するのがより好ましいが、通気コストおよび過剰通気による発泡の問題に配慮すれば、0.01vvm以上1vvm以下、さらにより好ましくは0.1vvm以上0.5vvm以下で通気することがさらにより好ましい。

- [0025] 本培養を明所で行なう場合に、シスト化は自然に誘発され、アスタキサンチン含量を高めることができる。

### 発明の効果

- [0026] 本発明の方法は、新規な培地組成で培養することによって、本培養において高いアスタキサンチン含量を有するヘマトコッカス・プルビアリス藻体をより多く得ることによって、細胞増殖およびアスタキサンチン合成を増大せしめ、より多くのアスタキサンチン含有脂質を得ることができる。従来の無機窒素源を用いる方法、あるいはAN/TN比が65%を超える酵母エキスのような有機窒素源を用いる方法に比べて、アスタキサンチン含有脂質の生産効率は、少なくとも1.5倍、例えば約2〜4倍高まる。例えば、本発明により得られるアスタキサンチンの量は、培養液当たり濃度で表すと、少なくとも10mg/L、好ましくは少なくとも15mg/L、より好ましくは少なくとも20mg/L、さらにより好ましくは少なくとも25mg/Lであり、細胞当たりの量で表すと、少なくとも40pg/細胞、好ましくは少なくとも50pg/細胞、より好ましくは少なくとも60pg/細胞、さらにより好ましくは少なくとも70pg/細胞、より好ましくは少なくとも80pg/細胞である。このように培地のAN/TN比を調整することにより、アスタキサンチン含有脂質またはアスタキサンチンの生産効率を向上させることができる。したがって、小型のリアクターを用いることが可能になる。それによって、均一混合が可能になり、品質を一定に制御することが

可能となる。

### 発明を実施するための最良の形態

[0027] 本発明の目的を達成するための限定されない具体例として、暗所培養法の場合を示す。まず緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスを、前培養培地へ接種する。前培養培地の組成としては、例えば酢酸ナトリウム 1.2g/L、塩化マグネシウム六水和物 0.2g/L、硫酸第一鉄七水和物 0.01g/L、塩化カルシウム二水和物 0.02g/Lに、CSL1g/L又は脱脂大豆粉1.0g/Lを添加した前培養培地を用いる。培地に接種した後、培養温度20℃で前培養(第1段目)を開始する。前培養では栄養細胞として増殖させ、4日間の培養を行なう。次いでこの培養液を、次段階の前培養(第2段目)の培地へ接種する。前培養の段数は、本培養の液量に応じて、適宜決めればよく、前培養の段数毎に同様の接種操作を繰り返す。前培養から、本培養へ接種する際は、前培養液をそのまま本培養培地へ接種する方法を用いることができるが、好ましくは、前培養液を遠心と上澄み除去によって濃縮し、得られた藻体懸濁液を本培養の培地へ接種する方法を用いる。本培養の培地としては、例えば初発培地としては酢酸ナトリウム 2.5g/L、塩化マグネシウム六水和物 0.2g/L、硫酸第一鉄七水和物 0.01g/L、塩化カルシウム二水和物 0.02g/Lに、CSL1.0g/L又は脱脂大豆粉1.0g/Lを加えた培地を、流加培地としては酢酸ナトリウム 3.7 g/L(培地当たり濃度として)を用いる。本培養培地へ、本培養培地量の10%に相当する前培養液量の藻体を接種した後、培養温度30℃、相対通気量0.5vvmで8日間培養する。次いで、明所培養の場合においても、光照射すること以外は、上述した暗所培養例と同様の方法で培養することができる。本発明においては、培地成分としてAN/TN比が65%以下の有機窒素源を用いることによって細胞増殖およびアスタキサンチン合成を促進させることが特徴であるが、本発明の培養方法を行なうことによって、従来培地で培養した場合を大きく上回る量のアスタキサンチン含有脂質を得ることが出来る。

### 藻体の回収

アスタキサンチン含有脂質の採取法として、まずは、本培養を終えた後、培養液をそのままかあるいは殺菌、濃縮などの処理を施した後、自然沈降、遠心分離、濾過などの既知の固液分離手段を用いてヘマトコッカス・プルビアリス藻体を回収する。固

液分離を助けるために、凝集剤や濾過助剤を添加してもよい。凝集剤としては、例えば、塩化アルミニウム、塩化カルシウム、アルギン酸ナトリウム、キトサンなどを使用できる。濾過助剤としては、例えば、珪藻土を使用できる。次いで、回収した藻体を好ましくは破碎するが、破碎しなくともよい。藻体破碎には、ガラスビーズを加えグライディングにより破碎する方法、浸透圧による方法、フレンチプレスを用いる方法、マントンゴーリンを用いる方法、氷結による方法、押出造粒機による方法、さらには超音波破碎法などの既知の方法の何れか一つあるいは組み合わせて行なう。藻体は好ましくは乾燥させるが、乾燥しなくともよい。藻体乾燥には、流動層乾燥、スプレードライ、凍結乾燥などの既知の方法の何れか一つあるいは組み合わせて行なう。また、培養液をそのままかあるいは滅菌、濃縮などの処理を施した後に、ドラムドライヤーや、加熱機能付造粒機などの機器で処理することによって、藻体回収、破碎、乾燥を同時に行なうこともできる。

- [0028] このようにして回収した藻体は、そのまま(すなわち破碎、乾燥前に)、あるいは破碎や乾燥などの処理を施した藻体を、アスタキサンチンとして種々の用途に用いることができる。例えば、養魚における発色飼料などの用途に利用することもできる。

#### 抽出・精製

上記によって得た藻体より、さらにメタノール、エタノール、ヘキサンあるいはアセトンなどの有機溶媒による抽出、超臨界炭酸ガスによる抽出、または圧搾による抽出を行なうことによってアスタキサンチン含有脂質を回収することができる。得られるアスタキサンチン含有脂質の構成成分の多くは、アスタキサンチン脂肪酸モノエステルであり、その他の構成成分として、アスタキサンチン脂肪酸ジエステル、遊離型アスタキサンチンを含んでいる(J. Ferment. Bioeng. 71:335-339 (1991); Phytochemistry 20:2561-2564 (1981))。

- [0029] さらにまた、アスタキサンチン含有脂質より、液体クロマトグラフィー、分子蒸留などの既知の分離精製手段を適宜利用することによって、アスタキサンチン、あるいは所望のアスタキサンチン純度を有するアスタキサンチン含有脂質を得ることもできる。

- [0030] このように、光照射リアクターの開発や暗所培養法の開発によって、屋内培養での生産が可能になりつつある。屋内培養および屋外閉鎖系培養では、培地殺菌などの

微生物管理をより確実に行なうことが可能であるため、従来の屋外開放系培養法では雑菌汚染などの制約条件によって使用できなかった有機窒素源を、より優れた管理条件下で使用する事が可能になる。

## 実施例

### [0031] ヘマトコッカス培養実験

#### 実施例1 シストによるアスタキサンチン生産に及ぼす培地組成の影響

緑藻ヘマトコッカス・プルビアリス (*Haematococcus pluvialis*) NIES-144を用いた。前培養の培地には、基本培地 (BM4培地: 酢酸ナトリウム 2.4 g/L、塩化マグネシウム六水和物 0.2 g/L、硫酸第一鉄七水和物 0.001 g/L、塩化カルシウム二水和物 0.002 g/L) に、酵母エキス 2 g/L および硝酸カリウム 1 g/L を加え、pH6.8 に調製した後、121℃、20分 で滅菌した培地を用いた。培地100mLを200mL容三角フラスコに調製し、4日間の静置培養を20℃で行なった。次いで、本培養としては、表1に示す各種培地100mLを200mL容三角フラスコに調製し、先の前培養液を10%(v/v)接種し、温度30℃、暗所条件で振盪培養を開始した。培養3日目および6日目に酢酸ナトリウム3.7 g/L (培養液量当たり濃度として) を添加し8日間の培養を行なった。

[0032] 培地に用いた有機窒素源のAN/TN比は、酵母エキス67%、CSLは33%、大豆粉は2%以下であった。

[0033] 細胞濃度の測定は、培養液を適宜希釈懸濁した後、トーマ血球計算盤を用いて細胞数を計測することにより行なった。アスタキサンチン濃度の測定法としては、細胞をグラスファイバーフィルターで吸引濾過して回収し、グラスファイバーフィルターと細胞を一緒に乳鉢で破碎した後、アセトン抽出した。遠心で得られたアセトン溶液上清の吸光度 (波長480nm、750nm) を測定してカロテノイド濃度を求めた ("A Practical Handbook of Sea Water Analysis" p.185-206, Fisheries Research Board of Canada (1968))。ヘマトコッカスのシスト細胞中に蓄積されるカロテノイドの殆どはアスタキサンチンであることを確認済みであることから (J. Ferment. Bioeng. 71(5):335-339 (1991))、得られたカロテノイド濃度をアスタキサンチン濃度として表した。

[0034] 培養の後、遠心分離により藻体を回収し、アセトン抽出によってアスタキサンチン含有脂質を回収した。



[0035] 培養の結果、得られたアスタキサンチン濃度は、各条件で1-1) 6.3 mg/L、1-2) 10.8 mg/L、1-3) 25.9 mg/L、1-4) 21.5 mg/L、1-5) 26.7 mg/L、1-6) 19.9 mg/Lであった。細胞形態に関しては、何れの条件でもシストが形成されたことを、顕微鏡観察によって確認した。

[0036] CSLおよび大豆粉をヘマトコッカスの培養に使用する培養方法は従来知られていなかった。本実施例により、CSLおよび/又は大豆粉を添加した新規な培地を用いることによって、細胞当たりアスタキサンチン含量および細胞濃度を増加せしめることができ、アスタキサンチン濃度の増加によって、より多くのアスタキサンチン含有脂質を回収できることが分かった。

[0037] [表1]

表 1

条件 No.	培地組成	培養液量当たり アスタキサンチン濃度 (mg/L)	培養液量当たり 細胞濃度 ( $\times 10^5$ cells/mL)	細胞当たりアスタキサンチン含量 (pg/cell)
1-1)	BM4 培地 +酵母エキス 2g/L +KNO <sub>3</sub> 1g/L	6.3	2.0	31.8
1-2)	BM4 培地 +CSL 0.1g/L	10.8	2.6	41.5
1-3)	BM4 培地 +CSL 1.0g/L	25.9	3.6	71.9
1-4)	BM4 培地 +大豆粉 0.1g/L	21.5	3.4	63.2
1-5)	BM4 培地 +大豆粉 1.0g/L	26.7	4.0	66.8
1-6)	BM4 培地 +CSL 0.1g/L +大豆粉 0.1g/L	19.9	3.6	55.3

CSL：コーンステープリカー

大豆粉：脱脂大豆粉

[0038] 実施例2 栄養細胞増殖に及ぼす新培地組成の影響

緑藻ヘマトコッカス・プルビアリス(Haematococcus pluvialis) NIES-144を用いた。

[0039] 実施例1と同等条件で前培養を行なった。次いで、本培養としては、表2に示す各種培地100mLを200mL容三角フラスコに調製し、先の前培養液を10%(v/v)接種し、温度16℃、暗所条件で静置培養を6日間行なった。有機窒素源のAT／TN比は実施例1と同等であった。

[0040] 培養の結果、得られた栄養細胞濃度は、酵母エキス/硝酸カリウム培地で $4.46 \times 10^5$  cells/mL、CSL添加培地で $7.07 \times 10^5$  cells/mL、大豆粉添加培地で $7.45 \times 10^5$  cells/mLであった。

[0041] [表2]

表 2

条件 No.	培地組成	培養液量当たり 細胞濃度 ( $\times 10^5$ cells/mL)
1-1)	BM4 培地 +酵母エキス 2g/L +KNO <sub>3</sub> 1g/L	4.46
1-2)	BM4 培地 +CSL 1.0 g/L	7.07
1-3)	BM4 培地 +大豆粉 1.0g/L	7.45

CSL：コーンステープリカー

大豆粉：脱脂大豆粉

[0042] 実施例3 栄養細胞増殖に及ぼす新培地組成の影響

緑藻ヘマトコッカス・プルビアリス(Haematococcus pluvialis) NIES-144を用いた。

[0043] 実施例1と同等条件で前培養を行なった。次いで、本培養としては、表3に示す各種培地100mLを200mL容三角フラスコに調製し、先の前培養液を10%(v/v)接種し、温度20℃、暗所条件で静置培養を5日間行なった。

[0044] 培地に用いた有機窒素源のAT／TN比は、酵母エキス67%、トリプトン40%、ペプトン38%、ポリペプトン42.6%であった。

[0045] 培養の結果、得られた栄養細胞濃度は、酵母エキス／硝酸カリウム培地で $3.4 \times 10^5$  cells/mL、トリプトン添加培地で $5.7 \times 10^5$  cells/mL、ペプトン添加培地で $7.4 \times 10^5$

cells/mL、ポリペプトン添加培地で $4.4 \times 10^5$  cells/mLであった。

[0046] [表3]

表 3

条件 No.	培地組成	培養液量当たり細胞濃度 ( $\times 10^5$ cells/mL)
1-1)	BM4 培地+酵母エキス 2g/L +KNO <sub>3</sub> 1g/L	3.4
1-2)	BM4 培地 +トリプトン 1.0 g/L	5.7
1-3)	BM4 培地 +ペプトン 1.0g/L	7.4
1-4)	BM4 培地 +ポリペプトン 1.0g/L	4.4

[0047] 実施例4 明所培養における、シストによるアスタキサンチン生産に及ぼす培地組成の影響

緑藻ヘマトコッカス・プルビアリス (Haematococcus pluvialis) NIES-144を用いた。

[0048] 前培養の培地には、基本培地 (BM4培地: 酢酸ナトリウム 2.4 g/L、塩化マグネシウム六水和物 0.2 g/L、硫酸第一鉄七水和物 0.001 g/L、塩化カルシウム二水和物 0.002 g/L) に、酵母エキス 2 g/Lおよび硝酸カリウム 1 g/Lを加え、pH6.8に調製した培地を用いた。培地100mLを200mL容三角フラスコに調製し、4日間の静置培養を20℃で行なった。次いで、本培養としては、表4に示す各種培地100mLを200mL容三角フラスコに調製し、先の前培養液を10%(v/v)接種し、温度30℃、明所条件 (照度2000ルクス) で振盪培養を開始した。培養3日目に酢酸ナトリウム3.7g/L (培養液量当たり濃度として) を添加し6日間の培養を行なった。

[0049] 培養の結果、得られたアスタキサンチン濃度は、各条件で1-1) 8.2 mg/L、1-2) 14.2 mg/L、1-3) 32.0 mg/L、1-4) 25.0 mg/L、1-5) 32.0 mg/L、1-6) 24.1 mg/Lであった。細胞形態に関しては、何れの条件でもシストが形成されたことを、顕微鏡観察によって確認した。

[0050] CSLおよび大豆粉をヘマトコッカスの培養に使用する培養方法は従来知られていなかった。本実施例により、CSLおよび/又は大豆粉を添加した新規な培地を用いる

ことによって、細胞当たりアスタキサンチン含量および細胞濃度を増加せしめることができ、アスタキサンチン濃度の増加によって、より多くのアスタキサンチン含有脂質を回収できることが分かった。

[0051] [表4]

表 4

条件 No.	培地組成	培養液量当たり アスタキサンチン濃度 (mg/L)	培養液量当たり 細胞濃度 ( $\times 10^5$ cells/mL)	細胞当たりアスタキサンチン含量 (pg/cell)
1-1)	BM4 培地 +酵母エキス 2g/L +KNO <sub>3</sub> 1g/L	8.2	2.2	37.3
1-2)	BM4 培地 +CSL 0.1g/L	14.2	2.9	49.0
1-3)	BM4 培地 +CSL 1.0g/L	32.0	3.9	82.1
1-4)	BM4 培地 +大豆粉 0.1g/L	25.0	3.6	69.4
1-5)	BM4 培地 +大豆粉 1.0g/L	34.1	4.5	75.8
1-6)	BM4 培地 +CSL 0.1g/L +大豆粉 0.1g/L	25.5	3.9	65.4

CSL：コーンスティープリカー

大豆粉：脱脂大豆粉

[0052] 実施例5 栄養細胞増殖に及ぼす新培地組成の影響

緑藻ヘマトコッカス・プルビアリス(Haematococcus pluvialis) NIES-144を用いた。

[0053] 実施例1と同等条件で前培養を行なった。次いで、本培養としては、表5に示す各種培地100mLを200mL容三角フラスコに調製し、先の前培養液を10%(v/v)接種し、温度16℃、明所条件(照度1500ルクス)で静置培養を3日間行なった。

[0054] 培養の結果、得られた栄養細胞濃度は、酵母エキス/硝酸カリウム培地で $4.3 \times 10^5$  cells/mL、CSL添加培地で $6.9 \times 10^5$  cells/mL、大豆粉添加培地で $7.3 \times 10^5$  cells/mLであった。



[0055] [表5]

表 5

条件 No.	培地組成	培養液量当たり 細胞濃度 ( $\times 10^5$ cells/mL)
1-1)	BM4 培地 +酵母エキス 2g/L +KNO <sub>3</sub> 1g/L	4.3
1-2)	BM4 培地 +CSL 1.0 g/L	6.9
1-3)	BM4 培地 +大豆粉 1.0g/L	7.3

CSL：コーンステープリカー

大豆粉：脱脂大豆粉

## 請求の範囲

- [1] 緑藻を、窒素源としてAN／TN比が65%以下、好ましくは43%以下、より好ましくは35%以下の有機窒素源を培地中に用いて培養して、アスタキサンチンを蓄積させた藻体を得ることからなる、アスタキサンチン含有脂質の製造方法。
- [2] 得られた藻体からアスタキサンチン含有脂質を抽出し、所望により該脂質をさらに精製することからなる、請求項1の方法。
- [3] 有機窒素源が、コーンステープリカー、大豆粉、ペプトン、トリペプトンおよびポリペプトンからなる群から選択される少なくとも一種の有機窒素源である、請求項1の方法。
- [4] 有機窒素源を、0.1 g/L以上用いる、請求項1ないし3のいずれか1項の方法。
- [5] 培養を暗所でリアクター内で行う、請求項4の方法。
- [6] 培養を好氣的条件で行う、請求項5の方法。
- [7] 培養を明所で屋内リアクターまたは屋外閉鎖系で行う、請求項4の方法。
- [8] アスタキサンチンが、少なくとも培養液あたりの濃度10mg／L、または40pg／細胞で蓄積される、請求項5または6の方法。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003465

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12P23/00/A23D9/007, A23L1/30 (C12P23/00, C12R1:89)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12P1/00-41/00, A23D9/00-06, A23L1/00-48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLIN/WPIDS (STN), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 3163127 B2 (Higashimaru Shoyu Co., Ltd.), 23 February, 2001 (23.02.01), (Family: none)	1-8
A	Liu JG., et al., Dynamic changes of inorganic nitrogen and astaxantin accumulation in Heamatococcus pluvialis., Chinese, J.Oceano. Limnol., 2002, Vol.20, No.4, pages 358 to 364	1-8
A	JP 2003-189846 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 08 July, 2003 (08.07.03), & WO 03/033683 A1	1-8
A	WO 92/21764 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 12 October, 1992 (12.10.92), & EP 543023 A1	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 April, 2005 (25.04.05)

Date of mailing of the international search report

17 May, 2005 (17.05.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup>

C12P23/00 // A23D9/007, A23L1/30, (C12P23/00, C12R1:89)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup>

C12P1/00-41/00, A23D9/00-06, A23L1/00-48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)、JICST ファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 3163127 B2 (ヒガシマル醤油株式会社) 2001. 02. 23 (ファミリーなし)	1-8
A	Liu JG, et al. Dynamic changes of inorganic nitrogen and astaxantin accumulation in Heamatococcus pluvialis., Chinese J. Oceano. Limnol., 2002, vol. 20, no. 4, p. 358-364	1-8
A	JP 2003-189846 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2003. 07. 08 & WO 03/033683 A1	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 04. 2005

国際調査報告の発送日

17. 5. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

斎藤 真由美

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4 B

3539



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 92/21764 A1 (協和発酵工業株式会社) 1992. 10. 12 & EP 543023 A1	1-8